

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-003785

(43)Date of publication of application : 14.01.1993

(51)Int.Cl.

C12N 9/02
 C12N 1/21
 C12N 15/53
 // C12P 7/02
 (C12N 1/21
 C12R 1:19)

(21)Application number : 03-284795

(71)Applicant : MERCIAN CORP

(22)Date of filing : 30.10.1991

(72)Inventor : NISHIMURA HAJIME
 KAWAKAMI YASUSHI
 IMAMURA KOJI

(30)Priority

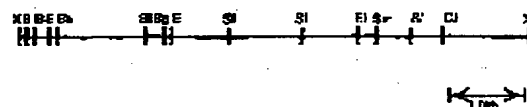
Priority number : 03 84170 Priority date : 16.04.1991 Priority country : JP

(54) BENZENE DIOXYGENASE GENE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject gene, containing a benzene dioxygenase gene and cisbenzene glycol dehydrogenase gene, etc., and capable of exhibiting a specific restriction enzyme map and efficiently affording cisbenzene glycol from benzene.

CONSTITUTION: Chromosomic DNA is separated from *Pseudomonas.aeruginosa* J1104 strain (FERM P-12180) having benzene-assimilating ability and digested with a restriction enzyme XhoI to afford the objective gene which is a DNA of about 7.2kb, containing a benzene dioxygenase gene, cisbenzene glycol dehydrogenase gene and catechol 2,3-oxygenase gene and having the number of cleavage with restriction enzymes as follows. PstI and SphI; 6, SalI; 5, EcoRI (E) and BamHI (B); 2, SmaI (Sm), BglII (Bg), SacI (Sa), XhoI (X) and ClaI (Cl); 1 and XbaI, HindIII and KpnI; 0 and further a restriction enzyme map expressed by the formula.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 07.01.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]	3001694
[Date of registration]	12.11.1999
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]	
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]	
[Date of extinction of right]	

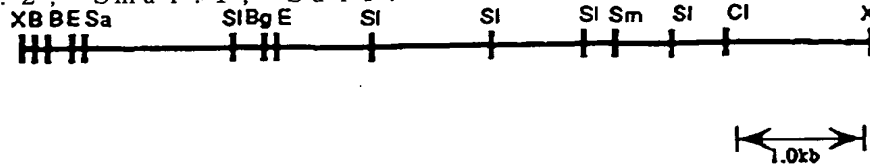
1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子、シスベンゼングリコールデヒドロゲナーゼ遺伝子、及びカテコール 2, 3-オキシゲナーゼ遺伝子を含む約7.2 KbのDNAであって、制限酵素の切断数がPst I:

6; EcoR I: 2; Sma I: 1; Sal I:



5; Bgl I I: 1; BamH I: 2; Sac I: 1; Xho I: 1; Xba I: 0; Hind I I I: 0; Kpn I: 0; Sph I: 6; 及び Cla I: 1であり、以下に示す制限酵素地図【化1】

(上記制限酵素地図中、B: BamH I; Bg: Bgl I I; Cl: Cla I;

E: EcoR I; Sa: Sac I; Sl: Sal I; Sm: Sma I; 及び X: Xho Iを示す)

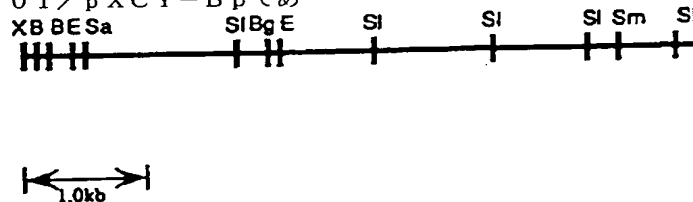
を有することを特徴とするDNA。

【請求項2】 請求項1記載のDNAを有する組み換えベクターDNA。

【請求項3】 プラスミドpXCY-Bpである請求項2記載の組み換えベクターDNA。

【請求項4】 請求項2記載のベクターで形質転換されベンゼンジオキシゲナーゼ、シスベンゼングリコールデヒドロゲナーゼ、及びカテコール 2, 3-オキシゲナーゼを産生する微生物。

【請求項5】 大腸菌HB101/pXCY-Bpであ



る請求項4記載の微生物。

【請求項6】 ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子を含む約5.6 KbのDNAであって、制限酵素の切断数がPst I: 4; EcoR I: 2; Sma I: 1; Sal I: 5; Bgl I I: 1; BamH I: 2; Sac I: 1; Xho I: 1; Xba I: 0; Hind I I I: 0; Kpn I: 0; Sph I: 6; 及び Cla I: 0であり、以下に示す制限酵素地図【化2】

【化2】

(上記制限酵素地図中、B: BamH I; Bg: Bgl I I; E: EcoR I;

Sa: Sac I; Sl: Sal I; Sm: Sma I; 及び X: Xho Iを示す)

を有することを特徴とするDNA。

【請求項7】 請求項6記載のDNAを有する組み換えベクターDNA。

【請求項8】 プラスミドpBPT8-1である請求項7記載の組み換えベクターDNA。

【請求項9】 請求項8記載のベクターで形質転換され

ベンゼンジオキシゲナーゼを産生する微生物。

【請求項10】 大腸菌HB101/pBPT8-1である請求項9記載の微生物。

【請求項11】 以下に示す領域I、II、III、IV、及びVを含み、ベンゼンジオキシゲナーゼをコードするDNA。

領域 I

ATG AGC TCA TCA ATC AAA GAA GTG CAG GGA GCC CCT GTG AAG TGG GTT
ACC AAT TGG ACG CCG GAG GCG ATC CGG GGG TTG GTC GAT CAG GAA AAA
GGG CTG CTT GAT CCA CGC ATC TAC GCC GAT CAG AGT CTT TAT GAG CTG
GAG CTT GAG CGG GTT TTT GGT CGC TCT TGG CTG TTA CTT GGG CAC GAG
AGT CAT GTG CCT GAA ACC GGG GAC TTC CTG GCC ACT TAC ATG GGC GAA
GAT CCG GTG GTT ATG GTG CGA CAG AAA GAC AAG AGC ATC AAG GTG TTC

CTG AAC CAG TGC CGC GGC ATG CGT ATC TGC CGC TCG GAC GCC GGC AAC
 GCC AAG GCT TTC ACC TGC AGC TAT CAC GGC TGG GCC TAC GAC ATC GCC
 GGC AAG CTG GTG AAC GTG CCG TTC GAG AAG GAA GCC TTT TGC GAC AAG
 AAA GAA GGC GAC TGC GGC TTT GAC AAG GCC GAA TGG GGC CCG CTC CAG
 GCA CGC GTG GCA ACC TAC AAG GGC CTG GTC TTT GCC AAC TGG GAT GTG
 CAG CGC CCA GAC CTG GAG ACC TAC CTC GGT GAC GCC CGC CCC TAT ATG
 GAC GTC ATG CTG GAT CGC ACG CCG GCC GGG ACT GTG GCC ATC GGC GGC
 ATG CAG AAG TGG GTG ATT CCG TGC AAC TGG AAG TTT GCC GCC GAG CAG
 TTC TGC AGT GAC ATG TAC CAC GCC GGC ACC ATG TCG CAC CTG TCC GGC
 ATC CTG GCG GGC ATG CCG CCG GAA ATG GAC CTG TCG CAT GCA CAG GTG
 CCC ACC AAG GGC AAC CAG TTC CCG GCC GGC TGG GGC GGC CAC GGC TCG
 GGC TGG TTC GTC GAC GAG CCG GGC ATG CTC ATG GCG GTG ATG GGC CCC
 AAG GTC ACC CAG TAC TGG ACC GAA GGT CCG GCT GCC GAC CTG GCA GAA
 CAG CGA CTG GGC CAC ACC ATG CCG GTT CGA CGC ATG TTC GGC CAG CAC
 ATG ACG ATC TTC CCG ACC TGT TCA TTC CTG CCC GCC ATC AAC ACC ATC
 CGG ACC TGG CAC CCG CGT GGT CCC AAT GAA ATC GAG GTG TGG GCC TTC
 ACC CTG GTC GAT GCC GAC GCC CCG GCG GAG ATC AAG GAA GAA TAT CGC
 CGG CAC AAC ATC CGC ACC TTC TCC GCA GGC GGC GTG TTT GAG CAG GAC
 GAT GGC GAG AAC TGG GTG GAG ATC CAG AAG GGC CTA CGT GGC TAC AAG
 GCC AAG AGC CAG CCG CTC AAT GCC CAG ATG GGC CTG GGT CCG TGC AGA
 CCG GAT CAC CCT GAT TTT CCT GGC AAC GTC GGC

領域II

ATG GTG GGC TGG ACG TGC ATG TGC AGA CGG CGC GCC GAG GTT CCG TCC
 CCT GAT ATT TAC TTG GAG ATA ACT ATT ATG ACA AAT CCA TCC CCG CAT
 TTT TTC AAA ACA TTT GAA TGG CCA AGC AAG GCG GCT GGC CTT GAG TTG
 CAG AAC GAG ATC GAG CAG TTC TAC TAC CGC GAA GCG CAG TTG CTT GAC
 CAC CGG GCC TAC GAG GCC TGG TTT GCC CTG CTG GAC AAA GAT ATC CAC
 TAC TTC ATG CCG CTG CGC ACC AAT CGC ATG ATC CGG GAG GGC GAG CTG
 GAA TAT TCC GGC GAC CAG GAT ATT GCC CAT TTC GAT GAA ACC CAT GAA
 ACC ATG TAC GGG CGC ATC CGC AAG GTG ACC TCG GAC GTG GGC TGG CCG
 GAG AAC CCG CCT TCC CGC ACG CGC CAC CTG GTC TCC AAC GTC ATC GTC
 AAG GAG ACG GCC ACG CCG GAT ACC TTC GAG GTC AAT TCC GCA TTC ATC
 CTG TAC CGC AAT CCG CTT GAG CGC CAG GTC GAC ATC TTC GCG GGC GAA
 CGC CGG GAC GTG CTG CGC CGC GCC GAC AAC AAC CTT GGT TTC AGC ATC
 GCC AAG CGC ACC ATC CTG CTC GAC GCC AGT ACC TTG CTG TCG AAC AAC
 CTG AGC ATG TTC TTC

領域III

ATG AAA AAT GCA AGA CTG TTT TTG ATC GCC ATC GGC GTC TTC TAC ATC
 ATC AAC CTC ATT GGC ACG CTT CCC TTC AGC ACG TTG GGC TTG TTT GGC
 AGG ATG TAT CCA GGC GTA GAA CTG CAC GTG GGT GCG CCG ATT TTC ACC
 CTG CTG CAG GAT GCC TGG GCG GTG GTC GGT CTC CAG TTG GGC GCC ATC
 GGG GCC GTC GCT TTG TGG GGC GCC CGC GAT CCG GGC CGT TAT CGG GCC
 GTT ATT CCA GTG GTC ATC GCA ACG GAA GTG GTC GAT GGC CTC TGG GAT
 TTT TAC AGC ATC GTG TGG AGC CAC GAA GCC TTG TGG TTC GGC CTT GTC
 ACG CTG GTG ATC CAT GTG CTG TGG ATT GGC TGG GGC CTG CAT GCC TGG
 CGT GCC TGG CGT CGA AAT CGC

領域IV

ATG AAA TTT ACC AGA GTT TGT GAT CGA AGA GAT GTG CCC GAA GGC GAA
 GCC CTG AAG GTC GAA AGT GGA GGC ACC TCC GTC GCG ATT TTC AAT GTG
 GAT GGC GAG CTG TTC GCA ACA CAG GAC CGC TGC ACC CAC GGC GAC TGG

TCC CTG TCC GAT GGC GGC TAT CTT GAA GGT GAC GTG GTG GAA TGC TCA
 CTG CAC ATG GGG AAG TTT TGC GTT CGC ACG GGC AAG GTC AAA TCA CCG
 CCG CCC TGT GAG GCA CTG AAG ATA TTT CCG ATC CGC ATC GAA GAC AAT
 GAC GTG CTG GTC GAC TTC GAA GCC GGG TAT CTG GCG CC

領域V

ATG ATC GAC ACC ATC GCC ATC ATC GGC GCC GGC CTG GCC GTT CGA CGG
 CTG CGC GCG CAC TGC CGC CAG GGA TAC GAG GGG CGC ATC CAC CTG CTC
 GGG GAT GAG TCG CAT CAG GCC TAT GAC CGG ACC ACG CTG TCC AAG ACG
 GTG CTG GCG GGC GAG CAG CCC GAG CCG CCT GCA ATC CTG GAC AGC GCC
 TGG TAC GCA TCG GCC CAT GTG GAT GTC CAG CTC GGG CGA CGG GTG AGT
 TGC CTG GAT CTG GCC AAC CGC CAG ATT CAG TTT GAA TCG GGC GCC CCG
 CTG GCC TAC GAC CGG CTG CTG CTG GCC ACC GGC GCG CGC GCC CGG CGC
 ATG GCG ATT CGG GGT GGC GAC CTG GCA GGC ATC CAT ACC TTG CGA GAC
 CTC GCC GAC AGC CAG GCG CTG CGG CAG GCG CTG CAA CCG GGC CAG TCG
 CTG GTC ATC GTC GGC GGA GGC CTG ATC GGT TGC GAG GTG GCG ACC ACC
 GCC CGC AAG CTG AGT GTC CAT GTC ACG ATT CTG GAA GCC GGC GAC GAG
 TTG CTG GTG CGC GTG CTG GGT CAC CGG ACC GGG GCA TGG TGT CGG GCC
 GAA CTG GAA CGC ATG GGT GTC CGC GTG GAG CGC AAT GCA CAG GCC GCG
 CGC TTC GAA GGC CAG GGG CAG GTG CGC GCC GTG ATC TGC GCC GAC GGG
 CGC CGG GTG CCC GCC GAT GTG GTC TTG GTC AGC ATT GGC GCC GAG CCG
 GCG GAC GAG CTG GCC CGT GCC GCT GGC ATC GCC TGC GCG CGC GGC GTG
 CTG GTC GAC GCC ACC GGC GCC ACC TCG TGT CCA GAG GTG TTC GCC GCC
 GGT GAC GTC GCC GCC TGG CCG CTG CGT CAA GGG GGC CAG CGC TCG CTG
 GAG ACC TAC CTG AAC AGC CAG ATG GAG GCC GAA ATC GCG GCC AGC GCC
 ATG TTG AGT CAG CCC GTG CCG GCG CCC CAG GTG CCG ACC TCG TGG ACG
 GAG ATT GCA GGC CAC CGC ATC CAG ATG ATT GGC GAT GCC GAA GGG CCC
 GGC GAG ATC GTC GTA CGC GGC GAC GCC CAG AGC GGC CAG CCA ATC GTG
 TTG CTC AGG CTG CTT GAT GGC TGC GTC GAG GCC GCG ACG GCG ATC AAT
 GCC ACC AGG GAA TTT TCT GTG GCG ACC CGA CTG GTC GGC ACC CGG GTT
 TCT GTT TCC GCC GAG CAA CTG CAG GAC GTC GGC TCG AAC CTG CGG GAT
 TTA CTC AAA GCC AAA CCG AAT

【請求項12】 下記のポリペプチドをコードするDN A。

Met Ser Ser Ser Ile Lys Glu Val Gln Gly Ala Pro Val Lys Trp Val
 Thr Asn Trp Thr Pro Glu Ala Ile Arg Gly Leu Val Asp Gln Glu Lys
 Gly Leu Leu Asp Pro Arg Ile Tyr Ala Asp Gln Ser Leu Tyr Glu Leu
 Glu Leu Glu Arg Val Phe Gly Arg Ser Trp Leu Leu Leu Gly His Glu
 Ser His Val Pro Glu Thr Gly Asp Phe Leu Ala Thr Tyr Met Gly Glu
 Asp Pro Val Val Met Val Arg Gln Lys Asp Lys Ser Ile Lys Val Phe
 Leu Asn Gln Cys Arg Gly Met Arg Ile Cys Arg Ser Asp Ala Gly Asn
 Ala Lys Ala Phe Thr Cys Ser Tyr His Gly Trp Ala Tyr Asp Ile Ala
 Gly Lys Leu Val Asn Val Pro Phe Glu Lys Glu Ala Phe Cys Asp Lys
 Lys Glu Gly Asp Cys Gly Phe Asp Lys Ala Glu Trp Gly Pro Leu Gln
 Ala Arg Val Ala Thr Tyr Lys Gly Leu Val Phe Ala Asn Trp Asp Val
 Gln Ala Pro Asp Leu Glu Thr Tyr Leu Gly Asp Ala Arg Pro Tyr Met
 Asp Val Met Leu Asp Arg Thr Pro Ala Gly Thr Val Ala Ile Gly Gly
 Met Gln Lys Trp Val Ile Pro Cys Asn Trp Lys Phe Ala Ala Glu Gln
 Phe Cys Ser Asp Met Tyr His Ala Gly Thr Met Ser His Leu Ser Gly
 Ile Leu Ala Gly Met Pro Pro Glu Met Asp Leu Ser His Ala Gln Val
 Pro Thr Lys Gly Asn Gln Phe Arg Ala Gly Trp Gly Gly His Gly Ser
 Gly Trp Phe Val Asp Glu Pro Gly Met Leu Met Ala Val Met Gly Pro

Lys Val Thr Gln Tyr Trp Thr Glu Gly Pro Ala Ala Asp Leu Ala Glu
 Gln Arg Leu Gly His Thr Met Pro Val Arg Arg Met Phe Gly Gln His
 Met Thr Ile Phe Pro Thr Cys Ser Phe Leu Pro Ala Ile Asn Thr Ile
 Arg Thr Trp His Pro Arg Gly Pro Asn Glu Ile Glu Val Trp Ala Phe
 Thr Leu Val Asp Ala Asp Ala Pro Ala Glu Ile Lys Glu Glu Tyr Arg
 Arg His Asn Ile Arg Thr Phe Ser Ala Gly Gly Val Phe Glu Gln Asp
 Asp Gly Glu Asn Trp Val Glu Ile Gln Lys Gly Leu Arg Gly Tyr Lys
 Ala Lys Ser Gln Pro Leu Asn Ala Gln Met Gly Leu Gly Arg Cys Arg
 Pro Asp His Pro Asp Phe Pro Gly Asn Val Gly

【請求項13】 下記のポリペプチドをコードするDN 10 A。

Met Val Gly Trp Thr Cys Met Cys Arg Arg Arg Ala Glu Val Pro Ser
 Pro Asp Ile Tyr Leu Glu Ile Thr Ile Met Thr Asn Pro Ser Pro His
 Phe Phe Lys Thr Phe Glu Trp Pro Ser Lys Ala Ala Gly Leu Glu Leu
 Gln Asn Glu Ile Glu Gln Phe Tyr Tyr Arg Glu Ala Gln Leu Leu Asp
 His Arg Ala Tyr Glu Ala Trp Phe Ala Leu Leu Asp Lys Asp Ile His
 Tyr Phe Met Pro Leu Arg Thr Asn Arg Met Ile Arg Glu Gly Glu Leu
 Glu Tyr Ser Gly Asp Gln Asp Ile Ala His Phe Asp Glu Thr His Glu
 Thr Met Tyr Gly Arg Ile Arg Lys Val Thr Ser Asp Val Gly Trp Ala
 Glu Asn Pro Pro Ser Arg Thr Arg His Leu Val Ser Asn Val Ile Val
 Lys Glu Thr Ala Thr Pro Asp Thr Phe Glu Val Asn Ser Ala Phe Ile
 Leu Tyr Arg Asn Arg Leu Glu Arg Gln Val Asp Ile Phe Ala Gly Glu
 Arg Arg Asp Val Leu Arg Arg Ala Asp Asn Asn Leu Gly Phe Ser Ile
 Ala Lys Arg Thr Ile Leu Leu Asp Ala Ser Thr Leu Leu Ser Asn Asn
 Leu Ser Met Phe Phe

【請求項14】 下記のポリペプチドをコードするDN A。

Met Lys Asn Ala Arg Leu Phe Leu Ile Ala Ile Gly Val Phe Tyr Ile
 Ile Asn Leu Ile Gly Thr Leu Pro Phe Ser Thr Leu Gly Leu Phe Gly
 Arg Met Tyr Pro Gly Val Glu Leu His Val Gly Ala Pro Ile Phe Thr
 Leu Leu Gln Asp Ala Trp Ala Val Val Gly Leu Gln Leu Gly Ala Ile
 Gly Ala Val Ala Leu Trp Gly Ala Arg Asp Pro Gly Arg Tyr Arg Ala
 Val Ile Pro Val Val Ile Ala Thr Glu Val Val Asp Gly Leu Trp Asp
 Phe Tyr Ser Ile Val Trp Ser His Glu Ala Leu Trp Phe Gly Leu Val
 Thr Leu Val Ile His Val Leu Trp Ile Gly Trp Gly Leu His Ala Trp
 Arg Ala Trp Arg Arg Asn Arg

【請求項15】 下記のポリペプチドをコードするDN A。

Met Lys Phe Thr Arg Val Cys Asp Arg Arg Asp Val Pro Glu Gly Glu
 Ala Leu Lys Val Glu Ser Gly Gly Thr Ser Val Ala Ile Phe Asn Val
 Asp Gly Glu Leu Phe Ala Thr Gln Asp Arg Cys Thr His Gly Asp Trp
 Ser Leu Ser Asp Gly Gly Tyr Leu Glu Gly Asp Val Val Glu Cys Ser
 Leu His Met Gly Lys Phe Cys Val Arg Thr Gly Lys Val Lys Ser Pro
 Pro Pro Cys Glu Ala Leu Lys Ile Phe Pro Ile Arg Ile Glu Asp Asn
 Asp Val Leu Val Asp Phe Glu Ala Gly Tyr Leu Ala Pro

【請求項16】 下記のポリペプチドをコードするD NA。

Met Ile Asp Thr Ile Ala Ile Ile Gly Ala Gly Leu Ala Val Arg Arg
 Leu Arg Ala His Cys Arg Gln Gly Tyr Glu Gly Arg Ile His Leu Leu
 Gly Asp Glu Ser His Gln Ala Tyr Asp Arg Thr Thr Leu Ser Lys Thr
 Val Leu Ala Gly Glu Gln Pro Glu Pro Pro Ala Ile Leu Asp Ser Ala
 Trp Tyr Ala Ser Ala His Val Asp Val Gln Leu Gly Arg Arg Val Ser
 Cys Leu Asp Leu Ala Asn Arg Gln Ile Gln Phe Glu Ser Gly Ala Pro
 Leu Ala Tyr Asp Arg Leu Leu Leu Ala Thr Gly Ala Arg Ala Arg Arg

Met Ala Ile Arg Gly Gly Asp Leu Ala Gly Ile His Thr Leu Arg Asp
 Leu Ala Asp Ser Gln Ala Leu Arg Gln Ala Leu Gln Pro Gly Gln Ser
 Leu Val Ile Val Gly Gly Gly Leu Ile Gly Cys Glu Val Ala Thr Thr
 Ala Arg Lys Leu Ser Val His Val Thr Ile Leu Glu Ala Gly Asp Glu
 Leu Leu Val Arg Val Leu Gly His Arg Thr Gly Ala Trp Cys Arg Ala
 Glu Leu Glu Arg Met Gly Val Arg Val Glu Arg Asn Ala Gln Ala Ala
 Arg Phe Glu Gly Gln Gly Gln Val Arg Ala Val Ile Cys Ala Asp Gly
 Arg Arg Val Pro Ala Asp Val Val Leu Val Ser Ile Gly Ala Glu Pro
 Ala Asp Glu Leu Ala Arg Ala Ala Gly Ile Ala Cys Ala Arg Gly Val
 Leu Val Asp Ala Thr Gly Ala Thr Ser Cys Pro Glu Val Phe Ala Ala
 Gly Asp Val Ala Ala Trp Pro Leu Arg Gln Gly Gly Gln Arg Ser Leu
 Glu Thr Tyr Leu Asn Ser Gln Met Glu Ala Glu Ile Ala Ala Ser Ala
 Met Leu Ser Gln Pro Val Pro Ala Pro Gln Val Pro Thr Ser Trp Thr
 Glu Ile Ala Gly His Arg Ile Gln Met Ile Gly Asp Ala Glu Gly Pro
 Gly Glu Ile Val Val Arg Gly Asp Ala Gln Ser Gly Gln Pro Ile Val
 Leu Leu Arg Leu Leu Asp Gly Cys Val Glu Ala Ala Thr Ala Ile Asn
 Ala Thr Arg Glu Phe Ser Val Ala Thr Arg Leu Val Gly Thr Arg Val
 Ser Val Ser Ala Glu Gln Leu Gln Asp Val Gly Ser Asn Leu Arg Asp
 Leu Leu Lys Ala Lys Pro Asn

【請求項17】 下記のポリペプチドI、II、III、I 20 V、及びVを含むベンゼンジオキシゲナーゼ。

ポリペプチドI

Met Ser Ser Ser Ile Lys Glu Val Gln Gly Ala Pro Val Lys Trp Val
 Thr Asn Trp Thr Pro Glu Ala Ile Arg Gly Leu Val Asp Gln Glu Lys
 Gly Leu Leu Asp Pro Arg Ile Tyr Ala Asp Gln Ser Leu Tyr Glu Leu
 Glu Leu Glu Arg Val Phe Gly Arg Ser Trp Leu Leu Leu Gly His Glu
 Ser His Val Pro Glu Thr Gly Asp Phe Leu Ala Thr Tyr Met Gly Glu
 Asp Pro Val Val Met Val Arg Gln Lys Asp Lys Ser Ile Lys Val Phe
 Leu Asn Gln Cys Arg Gly Met Arg Ile Cys Arg Ser Asp Ala Gly Asn
 Ala Lys Ala Phe Thr Cys Ser Tyr His Gly Trp Ala Tyr Asp Ile Ala
 Gly Lys Leu Val Asn Val Pro Phe Glu Lys Glu Ala Phe Cys Asp Lys
 Lys Glu Gly Asp Cys Gly Phe Asp Lys Ala Glu Trp Gly Pro Leu Gln
 Ala Arg Val Ala Thr Tyr Lys Gly Leu Val Phe Ala Asn Trp Asp Val
 Gln Ala Pro Asp Leu Glu Thr Tyr Leu Gly Asp Ala Arg Pro Tyr Met
 Asp Val Met Leu Asp Arg Thr Pro Ala Gly Thr Val Ala Ile Gly Gly
 Met Gln Lys Trp Val Ile Pro Cys Asn Trp Lys Phe Ala Ala Glu Gln
 Phe Cys Ser Asp Met Tyr His Ala Gly Thr Met Ser His Leu Ser Gly
 Ile Leu Ala Gly Met Pro Pro Glu Met Asp Leu Ser His Ala Gln Val
 Pro Thr Lys Gly Asn Gln Phe Arg Ala Gly Trp Gly Gly His Gly Ser
 Gly Trp Phe Val Asp Glu Pro Gly Met Leu Met Ala Val Met Gly Pro
 Lys Val Thr Gln Tyr Trp Thr Glu Gly Pro Ala Ala Asp Leu Ala Glu
 Gln Arg Leu Gly His Thr Met Pro Val Arg Arg Met Phe Gly Gln His
 Met Thr Ile Phe Pro Thr Cys Ser Phe Leu Pro Ala Ile Asn Thr Ile
 Arg Thr Trp His Pro Arg Gly Pro Asn Glu Ile Glu Val Trp Ala Phe
 Thr Leu Val Asp Ala Asp Ala Pro Ala Glu Ile Lys Glu Glu Tyr Arg
 Arg His Asn Ile Arg Thr Phe Ser Ala Gly Gly Val Phe Glu Gln Asp
 Asp Gly Glu Asn Trp Val Glu Ile Gln Lys Gly Leu Arg Gly Tyr Lys
 Ala Lys Ser Gln Pro Leu Asn Ala Gln Met Gly Leu Gly Arg Cys Arg
 Pro Asp His Pro Asp Phe Pro Gly Asn Val Gly

ポリペプチドII

Met Val Gly Trp Thr Cys Met Cys Arg Arg Arg Ala Glu Val Pro Ser

Pro Asp Ile Tyr Leu Glu Ile Thr Ile Met Thr Asn Pro Ser Pro His
 Phe Phe Lys Thr Phe Glu Trp Pro Ser Lys Ala Ala Gly Leu Glu Leu
 Gln Asn Glu Ile Glu Gln Phe Tyr Tyr Arg Glu Ala Gln Leu Leu Asp
 His Arg Ala Tyr Glu Ala Trp Phe Ala Leu Leu Asp Lys Asp Ile His
 Tyr Phe Met Pro Leu Arg Thr Asn Arg Met Ile Arg Glu Gly Glu Leu
 Glu Tyr Ser Gly Asp Gln Asp Ile Ala His Phe Asp Glu Thr His Glu
 Thr Met Tyr Gly Arg Ile Arg Lys Val Thr Ser Asp Val Gly Trp Ala
 Glu Asn Pro Pro Ser Arg Thr Arg His Leu Val Ser Asn Val Ile Val
 Lys Glu Thr Ala Thr Pro Asp Thr Phe Glu Val Asn Ser Ala Phe Ile
 Leu Tyr Arg Asn Arg Leu Glu Arg Gln Val Asp Ile Phe Ala Gly Glu
 Arg Arg Asp Val Leu Arg Arg Ala Asp Asn Asn Leu Gly Phe Ser Ile
 Ala Lys Arg Thr Ile Leu Leu Asp Ala Ser Thr Leu Leu Ser Asn Asn
 Leu Ser Met Phe Phe

ポリペプチドIII

Met Lys Asn Ala Arg Leu Phe Leu Ile Ala Ile Gly Val Phe Tyr Ile
 Ile Asn Leu Ile Gly Thr Leu Pro Phe Ser Thr Leu Gly Leu Phe Gly
 Arg Met Tyr Pro Gly Val Glu Leu His Val Gly Ala Pro Ile Phe Thr
 Leu Leu Gln Asp Ala Trp Ala Val Val Gly Leu Gln Leu Gly Ala Ile
 Gly Ala Val Ala Leu Trp Gly Ala Arg Asp Pro Gly Arg Tyr Arg Ala
 Val Ile Pro Val Val Ile Ala Thr Glu Val Val Asp Gly Leu Trp Asp
 Phe Tyr Ser Ile Val Trp Ser His Glu Ala Leu Trp Phe Gly Leu Val
 Thr Leu Val Ile His Val Leu Trp Ile Gly Trp Gly Leu His Ala Trp
 Arg Ala Trp Arg Arg Asn Arg

ポリペプチドIV

Met Lys Phe Thr Arg Val Cys Asp Arg Arg Asp Val Pro Glu Gly Glu
 Ala Leu Lys Val Glu Ser Gly Gly Thr Ser Val Ala Ile Phe Asn Val
 Asp Gly Glu Leu Phe Ala Thr Gln Asp Arg Cys Thr His Gly Asp Trp
 Ser Leu Ser Asp Gly Gly Tyr Leu Glu Gly Asp Val Val Glu Cys Ser
 Leu His Met Gly Lys Phe Cys Val Arg Thr Gly Lys Val Lys Ser Pro
 Pro Pro Cys Glu Ala Leu Lys Ile Phe Pro Ile Arg Ile Glu Asp Asn
 Asp Val Leu Val Asp Phe Glu Ala Gly Tyr Leu Ala Pro

ポリペプチドV

Met Ile Asp Thr Ile Ala Ile Ile Gly Ala Gly Leu Ala Val Arg Arg
 Leu Arg Ala His Cys Arg Gln Gly Tyr Glu Gly Arg Ile His Leu Leu
 Gly Asp Glu Ser His Gln Ala Tyr Asp Arg Thr Thr Leu Ser Lys Thr
 Val Leu Ala Gly Glu Gln Pro Glu Pro Pro Ala Ile Leu Asp Ser Ala
 Trp Tyr Ala Ser Ala His Val Asp Val Gln Leu Gly Arg Arg Val Ser
 Cys Leu Asp Leu Ala Asn Arg Gln Ile Gln Phe Glu Ser Gly Ala Pro
 Leu Ala Tyr Asp Arg Leu Leu Leu Ala Thr Gly Ala Arg Ala Arg Arg
 Met Ala Ile Arg Gly Gly Asp Leu Ala Gly Ile His Thr Leu Arg Asp
 Leu Ala Asp Ser Gln Ala Leu Arg Gln Ala Leu Gln Pro Gly Gln Ser
 Leu Val Ile Val Gly Gly Gly Leu Ile Gly Cys Glu Val Ala Thr Thr
 Ala Arg Lys Leu Ser Val His Val Thr Ile Leu Glu Ala Gly Asp Glu
 Leu Leu Val Arg Val Leu Gly His Arg Thr Gly Ala Trp Cys Arg Ala
 Glu Leu Glu Arg Met Gly Val Arg Val Glu Arg Asn Ala Gln Ala Ala
 Arg Phe Glu Gly Gln Gly Gln Val Arg Ala Val Ile Cys Ala Asp Gly
 Arg Arg Val Pro Ala Asp Val Val Leu Val Ser Ile Gly Ala Glu Pro
 Ala Asp Glu Leu Ala Arg Ala Ala Gly Ile Ala Cys Ala Arg Gly Val
 Leu Val Asp Ala Thr Gly Ala Thr Ser Cys Pro Glu Val Phe Ala Ala
 Gly Asp Val Ala Ala Trp Pro Leu Arg Gln Gly Gly Gln Arg Ser Leu

Glu Thr Tyr Leu Asn Ser Gln Met Glu Ala Glu Ile Ala Ala Ser Ala
 Met Leu Ser Gln Pro Val Pro Ala Pro Gln Val Pro Thr Ser Trp Thr
 Glu Ile Ala Gly His Arg Ile Gln Met Ile Gly Asp Ala Glu Gly Pro
 Gly Glu Ile Val Val Arg Gly Asp Ala Gln Ser Gly Gln Pro Ile Val
 Leu Leu Arg Leu Leu Asp Gly Cys Val Glu Ala Ala Thr Ala Ile Asn
 Ala Thr Arg Glu Phe Ser Val Ala Thr Arg Leu Val Gly Thr Arg Val
 Ser Val Ser Ala Glu Gln Leu Gln Asp Val Gly Ser Asn Leu Arg Asp
 Leu Leu Lys Ala Lys Pro Asn

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ベンゼンを酸化してシスベンゼングリコールを生成する酵素活性を宿主微生物に付与する遺伝子を含むDNA、該DNAを含むプラスミド、及び該プラスミドで形質転換された微生物に関する。さらに本発明は、ベンゼンジオキシゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA、及びベンゼンジオキシゲナーゼを構成するポリペプチドに関する。

【0002】

【従来の技術】シスベンゼングリコール（シス-1, 2-ジヒドロキシ-シクロヘキサ-3, 5-ジエン）は、エンジニアリングプラスチックとして最近特に注目を集めているポリパラフェニレンの原料として有用な化合物であり、生化学的には、カテコールを介してオルト-又はメタ-パスウェイを経てTCAサイクルにより代謝される重要な化合物である。

【0003】従来、微生物を利用してシスベンゼングリコールを製造する方法としては、シュードモナス属に属する微生物をベンゼンを含む培地で培養してその培養物からシスベンゼングリコールを採取する方法（特開昭58-71891号公報）が知られているが、該方法は効率が悪く実用的ではなかった。一方、シスベンゼングリコールの生物学的代謝過程と類似の代謝過程により、ビフェニルを代謝する機能を有する外来遺伝子を保有する微生物として、シュードモナス・プチダKF138株（特開昭61-282068号公報）、シュードモナス・エルギノーザKF257株（特開昭61-282069号公報）、及びシュードモナス・シュードアルカリゲネスKF707株（特開昭61-282085号公報）が知られているが、該微生物はビフェニルを資化する作用を有するものの、ベンゼンに対して代謝作用を示してシスベンゼングリコールを産生するものではなかった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題及び課題を解決するための手段】本発明者は、ベンゼンを酸化してシスベンゼングリコールを生成する機能を有するベンゼンジオキシゲナーゼを保有する微生物から、該酵素をコードする遺伝子を単離すべく鋭意努力した結果、シュードモナス・エルギノーザに属する微生物からベンゼンジオキシゲナーゼをコードする遺伝子を単離することに成功し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明はベンゼンジオ

キシゲナーゼ遺伝子、シスベンゼングリコールデヒドロゲナーゼ遺伝子、及びカテコール 2, 3-オキシゲナーゼ遺伝子を含む約7.2 KbのDNAであって、図1に示す制限酵素地図を有することを特徴とするDNA、該DNAを有する組み換えベクターDNA、該ベクターで形質転換されベンゼンジオキシゲナーゼ、シスベンゼングリコールデヒドロゲナーゼ、及びカテコール 2, 3-オキシゲナーゼを産生する微生物と、ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子を含む約5.6 KbのDNAであって図2に示す制限酵素地図を有することを特徴とするDNA、該DNAを有する組み換えベクターDNA、及び該ベクターで形質転換されベンゼンジオキシゲナーゼを産生する微生物を提供するものである。また、本発明により、ベンゼンジオキシゲナーゼをコードするDNA、及びベンゼンジオキシゲナーゼを構成するポリペプチドが提供される。

【0005】ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子（BD O）を含むDNAの供給源としては、ベンゼンを資化してシスベンゼングリコールを生産する能力を有する微生物を利用することができ、このような性質を有する微生物のうち、例えばシュードモナス属に属する微生物を利用することができる。シュードモナス属に属する微生物としては、例えばシュードモナス・エルギノーザJ1104を使用することが好ましい。シュードモナス・エルギノーザJ1104は東京で採取された土壌から分離された微生物であり、工業技術院微生物工業技術研究所に平成3年4月6日付けで受託番号微工研菌寄第12180（FERM P-12180）として寄託されており、菌学的性質は以下の通りである。

【0006】本菌は極鞭毛を有するグラム陰性の桿菌で、運動性があり、絶対好気性かつ糖非発酵性である。以上の性質と電子顕微鏡による観察から、本菌はシュードモナス（Pseudomonas）属に属する微生物であると認められた。そこで、H. Oyaizu 及びK. Komagata の菌体脂脂肪酸分析によるシュードモナスの分類を以下の様に行った（J. Gen. Appl. Microbiol., 29, 17-14 (1983)）。

【0007】先ず、凍結乾燥菌体を5%NaOH/50%MeOHを用いて100℃で1時間ケン化した後、抽出した脂脂肪酸を15%BCl₃-MeOHを用いて85℃で5分間メチルエステル化し、次いでGLC分析を行った。ヒドロキシ酸はTLC分析により確認した。

GLC分析: 15% EGS (3.0 φmm×2.1m)、180℃

TLC分析: silica gel 60 TLC

(ジエチルエーテル: n-ヘキサン=1:4)

上記分析の結果、本菌の菌体脂肪酸成分は、12:0、14:0、16:0、16:1、18:0、18:1、Δ17、Δ19、3-OH・10:0、3-OH・12:0 (Trace)、2-OH・12:0から成ることが判明した。この他に、15:0、17:0、19:0も微量検出された。これらの分析結果より、本菌がH.Oyaizu 及びK. Komagata (J. Gen. Appl. Microbiol., 29, 17-14 (1983)) のGroup 1に属することが確認された。このグループには、シュードモナス・エルギノーザ (*Pseudomonas aeruginosa*)、P.プチダ (*P.putida*)、P.オーレオファシエンス (*P.aureofaciens*)、P.クロロラフィス (*P.chlororaphis*)、P.フローレッセンス (*P.fluoresces*)、P.スツツエエ (*P.stutzeri*)、及びP.メンドシーナ (*P.*

mendocina)等が包含されている。そして、本菌の菌体脂肪酸成分から2-OH・12:0が検出されること、2-OH・16:0が検出されないこと、Δ19が著量検出されること等の特徴は、上記 Group 1中のP.エルギノーザの菌体脂肪酸パターンに最も類似するものであった。本菌の菌体よりDNAを抽出してDNAのG-C含量をTm法で測定したところ、G-C含量は66.3モル%であった。この値はP.エルギノーザのG-C含量=67.2-68.0モル%と比べるとやや低く、P.プチダのG-C含量=62.5モル%とは明らかに異なるものであった。そこでシス-1, 2-ジヒドロキシシクロヘキサ-3, 5-ジエン生産菌として既知のP.プチダと本菌の菌学的性質を比較して、表1の結果を得た。

【0008】

表 1

分離菌

I. 形態

グラム染色性	陰 性
運動性	有
鞭 毛	極-1

II. 生理学的性質

色素の生成	
蛍光色素	-
ピオシアニン	-
カロチノイド	ピンク
生育 (41℃)	±
オキシダーゼ反応	+
脱窒反応	+
ゼラチンの水解	-
澱粉の水解	-

III. 生 育

グルコース	+
マルトース	±
シュークロース	-
マンニトール	-
グリセロール	+
L-リンゴ酸	+
酒石酸	-
コハク酸	+
マロン酸	-
ベタイン	+
ザルコシン	+
グラニオール	+
β-アラニン	+

DL-アルギニン	+
L-セリン	-
チロシン	+

但し、+：陽性

これらの結果から明かなように、本菌はP.ブチダとは明確に区別され、最も類似した菌はP.エルギノーサである。しかしながら、本分離菌は、特にゼラチンの加水分解、マンニトール、マロン酸等に対する挙動がP.エルギノーサと異なっており、G-C含量もP.エルギノーサと比べてやや低く、菌体が僅かにピンク色を呈するなど微妙な相違点も認められることから、本菌をP.エルギノーサの新変種であると同定した。

【0009】ベンゼンを資化してシスベンゼングリコールを生産する能力を有する微生物からベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子(BDO)を含む遺伝子を切り出すには、例えば以下の方法によればよい。ベンゼン資化能を有する上記の微生物を適当な培地、例えばLB培地(1リットル中にトリプトン10g/酵母エキス5g/塩化ナトリウム5gを含む)等で培養した後、例えばリゾチームを用いて菌体を融解して常法により染色体DNAを調製し、例えば制限酵素XhoIで消化することによりベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子を含む約7.2KbのDNA断片(NKKI1)を得ることができる。この様にして得たDNA断片を、制限酵素XhoIで消化したベクター、例えばプラスミドベクターであるpHSG396とライゲーションし、例えばハナハン法によりコンピテントセルとした大腸菌HB101に該組み換えベクターを導入して形質転換体を得、その後適当な選択手段、例えばクロラムフェニコールを含むLB培地で培養することにより形質転換株を選択することができる。

【0010】上記の形質転換株からベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子を含む組み換えベクターを有する形質転換株を選択するには、形質転換株を培養後にカテコールを散布して黄色を呈するコロニーを選択すればよい。これはベンゼンジオキシゲナーゼの遺伝子と同じ遺伝子領域にあるカテコール 2, 3-オキシゲナーゼを選択するものであり、カテコールがカテコール 2, 3-オキシゲナーゼで酸化された結果生成する2-ヒドロキシムコン酸6-セミアルデヒドが黄色を呈することを利用するものである。この様にして選択された形質転換体として、例えば大腸菌HB101/pXCY-Bpを挙げることができる。大腸菌HB101/pXCY-Bpは、ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子を含む約7.2KbのDNA断片(NKKI1)を含む組み換えプラスミドpXCY-Bpにより形質転換された微生物であり、工業技術院微生物工業技術研究所に平成3年4月6日付けで受託番号微工研菌寄第12178号(FERM P-12178)として寄託されている。

【0011】プラスミドpXCY-Bpに挿入されたN

-：陰性

KKI1は、ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子(BDO)、シスベンゼングリコールデヒドロゲナーゼ遺伝子(cBDH)、及びカテコール 2, 3-オキシゲナーゼ遺伝子(C23O)を含む約7.2KbのDNAであり、該NKKI1を消化する制限酵素の切断数はPstI:6; EcoRI:2; SmaI:1; SalI:5; BglII:1; BamHI:2; SacI:1; XhoI:1; XbaI:0; HindIII:0; KpnI:0; SphI:6; 及びClaI:1であり、NKKI1の制限酵素地図及び遺伝子のベンゼン代謝様式と遺伝子群との関係は図1に示す通りである。ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子としては特願昭62-278985号公報に記載されたものが知られているが、上記のNKKI1は上記公報に記載されたものとは異なる制限酵素地図を有するものである。

【0012】この様にして得られたプラスミドpXCY-Bp中のカテコール 2, 3-オキシゲナーゼ及びシスベンゼングリコールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子をエキソヌクレアーゼExoIIIにより除去することにより、ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子のみを含むDNA断片、例えばNKKI1-1(約5.6Kb)を得ることができる。上記のNKKI1(約7.2Kb)を制限酵素KpnI及びXbaIで消化した後エキソヌクレアーゼExoIIIで処理し、マングベーンヌクレアーゼで処理してDNAの1本鎖部分を除去し、その後クレンウフラグメントを加えてDNA末端の平滑化を行い、常法に従ってライゲーションすることにより、ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子を含む組み換えプラスミドを得ることができる。この様なプラスミドとしてプラスミドpBPT8-1を挙げることができ、該プラスミドを用いて常法により形質転換された形質転換体を、前記の方法により選択することにより大腸菌HB101/pBPT8-1を得ることができる。大腸菌HB101/pBPT8-1は、ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子を含む約5.6KbのDNA断片(NKKI1-1)を含むプラスミドpBPT8-1により形質転換された微生物であり、工業技術院微生物工業技術研究所に平成3年4月6日付けで受託番号微工研菌寄第12179(FERM P-12179)として寄託されている。

【0013】プラスミドpBPT8-1に挿入されたNKKI1-1は、ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子(BDO)を含む約5.6KbのDNAであり、該NKKI1-1を消化する制限酵素の切断数はPstI:4; EcoRI:2; SmaI:1; SalI:5; BglII:1; BamHI:2; SacI:1; Xh

oI:1; XbaI:0; HindIII:0;
KpnI:0; SphI:6; 及びClaI:0であ
り、NKKI1-1の制限酵素地図は図2に示す通りで
ある。

【0014】この様にして得た形質転換体を利用するこ
とによりベンゼンからシスベンゼングリコールを効率よ
く製造することができる。例えば、形質転換された微生
物を例えばM56等の培地中で、でエタノール、酢酸、
グルコース、乳酸等のエネルギー源およびベンゼンの存
在下、好ましくはベンゼンの蒸気下に培養することによ
り培地中にシスベンゼングリコールが製造される。反応
は25~42℃、好ましくは37℃で通常2~24時間
行えばよく、原料となるベンゼンの濃度は培養液の全量
に対して0.07~0.2%程度とすればよい。反応終了後
に、培養液からエーテル、塩化メチレン等を用いて抽出
することによりシスベンゼングリコールを効率よく製造
することができる。

【0015】

【発明の効果】ベンゼンの酸化によるシスベンゼングリ
コールの製造に有用なベンゼンジオキシゲナーゼをコード
する遺伝子、及びシスベンゼングリコールを効率よく
産生する能力を有する微生物が提供された。また、該微
生物を利用することによりシスベンゼングリコールを安
価に製造することが可能になった。

【0016】

【実施例】以下に本発明を実施例によりさらに具体的に
説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。
実施例1

ベンゼン資化能を有するシュードモナス・エルギノーザ
J I 104株を100mlのLB培地（1リットル中にトリ
プトン10g/酵母エキス5g/塩化ナトリウム5g
を含む）で一晩培養した後に集菌して50mMリン酸緩衝
液で洗浄した後に、菌体に10mlのSTE（10mMトリ
ス（pH7.5）/1mMEDTA/100mM塩化ナトリウ
ム）と5mMのリゾチームを加えて37℃で30分間イン
キュベートし、その後に-80℃で30分間凍結した。
菌体を融解し、0.8%サルコシルを含む20mlのSTE
と10mgのプロナーゼEを加えて37℃で1時間インキ
ュベートした後にフェノール処理とエタノール沈澱を行
った。得られたDNAから多糖類を除いた後、さらにフ
ェノール処理とエタノール沈澱を行い、得られたDNA
を10mMトリス/1mMEDTA緩衝液に懸濁した。

【0017】得られたDNAを制限酵素Sau3AI

（Y-100緩衝液：10mMトリス（pH7.5）/10mM
塩化マグネシウム/100mM塩化ナトリウム/6mMメル
カプトエタノールを含む）を用いて37℃で30分間処
理して部分消化し、0.8%アガロースゲル電気泳動によ
って5Kbから7KbのDNA断片を切り出した。この
DNA断片と制限酵素BamHIで消化したプラスミド
pUC19とライゲーションを行い、得られた組み換え

プラスミドpCY13を、宿主である大腸菌HB101
に導入してアンピシリン50μg/mlを含むLB培地で
成育可能な形質転換体を得た。

【0018】この培地上のコロニーに対しカテコール5
0mMを噴霧して黄変するコロニーを選択した。該コロ
ニーを培養することにより得られた菌体からカテコール
2, 3-オキシゲナーゼ遺伝子を有するプラスミドpC
Y13を抽出し、ジデオキシ法により塩基配列を決定し
た。これによりカテコール 2, 3-オキシゲナーゼ遺
伝子の遺伝子上での向きを明らかにし、pCY13に挿
入されたDNAの5'上流をプローブとして、シュード
モナス・エルギノーザJ I 104より抽出したDNAを
種々の制限酵素で消化したものを、1.0%アガロースゲ
ル電気泳動によりサザンブローディングを行った。この結
果、制限酵素XhoIによって消化される約7KbのD
NA断片中にカテコール 2, 3-オキシゲナーゼ及び
その上流を含むオペロンが含まれていることが推定され
た。

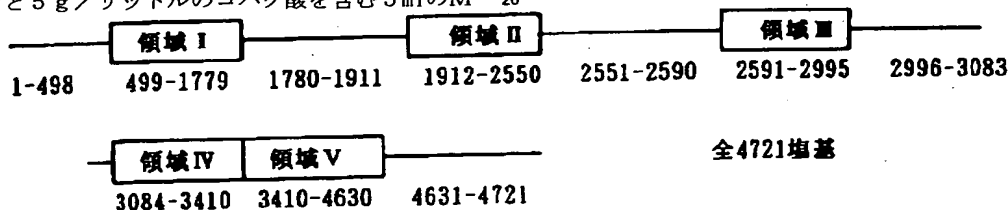
【0019】シュードモナス・エルギノーザJ I 104
染色体DNAを制限酵素XhoIで消化し、0.8%アガ
ロースゲルで電気泳動後、6Kbから8KbのDNA断
片を切り出し、制限酵素XhoIで消化したプラスミド
pHSG396とライゲーションし、得られた組み換え
プラスミドを大腸菌HB101に導入してクロラムフェ
ニコール34μg/mlを含むLB培地で培養し形質転換
株を選択した。この培地上のコロニーにカテコール50
mMを噴霧して黄変するコロニーを選択した。選択され
た形質転換株を5mlのLB培地で一晩培養した後に集菌、
洗浄し、プロリン20μg/mlとコハク酸5g/リッ
トルを含むM56培地（水1リットル中にNa₂HPO₄・7H₂O
8.2g/KH₂PO₄ 2.7g/(NH₂)₂SO₄ 1.0g/FeSO₄・7H₂O 0.23mg
を含む）に再懸濁して、ベンゼン蒸気下に37℃で2時
間培養した後に1mlを回収した。遠心分離により大腸菌
を除き、さらに限外濾過によって分子量10,000以
上の高分子を除いた後、HPLCによってシスベンゼン
グリコール及びカテコールの生産を確認した。形質転換
株からプラスミドpXCY-Bpを抽出して制限酵素処理、
0.8%アガロースゲル電気泳動、6%アクリリルア
ミドゲル電気泳動によってNKKI1の制限酵素地図を
作成した（図1参照）。

【0020】さらにベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子を
含む挿入DNA断片（NKKI1-1:5.6Kb）を組
み込んだプラスミドpBPT8-1を以下の様に作成し
た。5μgのプラスミドpXCY-Bpを制限酵素Kp
nI及びXbaIで消化した後、フェノール処理とエタ
ノール沈澱を行い、エキソヌクレアーゼExoIII緩衝
液（50mMトリス/1mM塩化マグネシウム/1mM2-メ
ルカプトエタノール）に懸濁し、150ユニットのエキ
ソヌクレアーゼExoIIIを加えて37℃で5分間イン
キュベートした、その後65℃で5分間インキュベート

してエキソヌクレアーゼ Exo III を失活させた。さらに等量のマングビーンヌクレアーゼ緩衝液 (60 mM 酢酸ナトリウム / 100 mM 塩化ナトリウム / 2 mM 酢酸亜鉛 / 10% グリセリン) 及び5ユニットのマングビーンヌクレアーゼを加えて37℃で1時間インキュベートしてDNAの1本鎖部分の除去を行った。さらにフェノール処理とエタノール沈澱を行ったうえで、クレノウフラグメント緩衝液 (6.7 mM リン酸カリウム / 6.7 mM 塩化マグネシウム / 1 mM 2-メルカプトエタノール / 33 μM dNTP) に懸濁し、5ユニットのクレノウフラグメントを加え37℃で15分間インキュベートしてDNA末端の平滑化を行い、常法に従ってライゲーションし、大腸菌 HB101 に導入した。尚、NKKI 1-1 の制限酵素地図は図2に示す通りである。

実施例2

ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子を含むプラスミド pBPT8-1 で形質転換された大腸菌 HB101 を、5 ml の LB 培地を用いて37℃で一晩培養した。4 × 10⁹ セル/ml の HB101 を集菌して洗浄し、20 μg/ml のプロリンと5 g/リットルのコハク酸を含む5 ml の M₂₀



【0022】該配列において、領域IVと領域Vの間は、領域IVをコードする配列が3411番目から3413番目の終止コドンで終了し、領域Vをコードする配列は3410番目から3412番目の開始コドンで開始するため、下記のように一部DNAが2重に読み込まれる。

【0023】

【化4】

開始 Ile
CC ATG ATG
Pro 終止

【0024】このため、以下の配列表においては、3408番目から3409番目の塩基によりコードされるアミノ酸をProとして表示してある。

【0025】

配列

CTCGAGACGC AATGTACGCC AAAGCGTGCT GAATGGTGAC GCTGAATGGG AGGCGCGGAT 60
CGTCAGTTCCG TTTCACCGAC TGTCATTGAT TGAAGAGCCC ACGATGCCGG ATCCGGCTCG 120
CTGGTTTAAT GAGTGGGAGC CAGTCAACCG CCGGTTTTCA CGAAGCTCTT ATCTCTGCCC 180
TGTTCGTCCG TCTGGATCCG GCGGTTCTTG TCCATCCTGT ATGTGCATAT GGAGCGCTAC 240
CGCCGATTGA CTGCTATGCA CAACCCGCCCT ACCAGAAACG TACATGAGGA GCATCTAGCA 300
CTTCGCGACA GCCGCTCGCC GGAGATGCCG AGCGCTGTGC TCGGTTGATG GCGGAGCACA 360
TCGAATCATC AATTTCCGGT GTTCGGGAAT TCGGTTTGTT GAGGTGACGC CAACATCCCA 420
CGTGTGTTGT TTCGTCTGTA TGGATGCCGT CGGCATTTTT TCGCCCTACT AAGGCATT 480

56培地に再懸濁した。ベンゼン蒸気下で22時間培養し、遠心分離、限外濾過によって精製して、HPLCによりシスベンゼングリコールの濃度を測定し (OD 275 nm)、シスベンゼングリコールが生産されたことを確認した。

実施例3

上記のNKKI 1-1の塩基配列は以下の様にして決定した。NKKI 1-1を各制限酵素により切り出した後にM13プラスミドに組み換え、またはNKKI 1-1をクロシーケンス法により削り縮めたサンプルを作製し、ベンゼンジオキシゲナーゼをコードする4.7 kbについてジデオキシ法により塩基配列を決定した。組み換えDNA作製法、クロシーケンス法、ジデオキシ法については常法に従った。その結果、ベンゼンジオキシゲナーゼをコードするDNAの配列は、以下に示す様に、5つのコード領域を含む4721塩基配列であることが明らかになった。

【0021】

【化3】

【配列表】配列の長さ: 7421

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

起源:

生物名: シュート*モナス エルギ*ノサ* (Pseudomonas aeruginosa)

株名: JI104

配列の特徴

特徴を表す記号: -10 signal

存在位置: 479..484

特徴を決定した方法: S

特徴を表す記号: -35 signal

存在位置: 455..460

特徴を決定した方法: S

23	24
CAAAGGAGAC GTTGAATC	498
ATG AGC TCA TCA ATC AAA GAA GTG CAG GGA GCC CCT GTG AAG TGG GTT	546
Met Ser Ser Ser Ile Lys Glu Val Gln Gly Ala Pro Val Lys Trp Val	
1 5 10 15	
ACC AAT TGG ACG CCG GAG GCG ATC CGG GGG TTG GTC GAT CAG GAA AAA	594
Thr Asn Trp Thr Pro Glu Ala Ile Arg Gly Leu Val Asp Gln Glu Lys	
20 25 30	
GGG CTG CTT GAT CCA CGC ATC TAC GCC GAT CAG AGT CTT TAT GAG CTG	642
Gly Leu Leu Asp Pro Arg Ile Tyr Ala Asp Gln Ser Leu Tyr Glu Leu	
35 40 45	
GAG CTT GAG CCG GTT TTT GGT CGC TCT TGG CTG TTA CTT GGG CAC GAG	690
Glu Leu Glu Arg Val Phe Gly Arg Ser Trp Leu Leu Glu Gly His Glu	
50 55 60	
AGT CAT GTG CCT GAA ACC GGG GAC TTC CTG GCC ACT TAC ATG GGC GAA	738
Ser His Val Pro Glu Thr Gly Asp Phe Leu Ala Thr Tyr Met Gly Glu	
65 70 75 80	
GAT CCG GTG GTT ATG GTG CGA CAG AAA GAC AAG AGC ATC AAG GTG TTC	786
Asp Pro Val Val Met Val Arg Gln Lys Asp Lys Ser Ile Lys Val Phe	
85 90 95	
CTG AAC CAG TGC CGC GGC ATG CGT ATC TGC CGC TCG GAC GCC GGC AAC	834
Leu Asn Gln Cys Arg Gly Met Arg Ile Cys Arg Ser Asp Ala Gly Asn	
100 105 110	
GCC AAG GCT TTC ACC TGC AGC TAT CAC GGC TGG GCC TAC GAC ATC GCC	882
Ala Lys Ala Phe Thr Cys Ser Tyr His Gly Trp Ala Tyr Asp Ile Ala	
115 120 125	
GGC AAG CTG GTG AAC GTG CCG TTC GAG AAG GAA GCC TTT TGC GAC AAG	930
Gly Lys Leu Val Asn Val Pro Phe Glu Lys Glu Ala Phe Cys Asp Lys	
130 135 140	
AAA GAA GGC GAC TGC GGC TTT GAC AAG GCC GAA TGG GGC CCG CTC CAG	978
Lys Glu Gly Asp Cys Gly Phe Asp Lys Ala Glu Trp Gly Pro Leu Gln	
145 150 155 160	
GCA CGC GTG GCA ACC TAC AAG GGC CTG GTC TTT GCC AAC TGG GAT GTG	1026
Ala Arg Val Ala Thr Tyr Lys Gly Leu Val Phe Ala Asn Trp Asp Val	
165 170 175	
CAG GCG CCA GAC CTG GAG ACC TAC CTC GGT GAC GCC CGC CCC TAT ATG	1074
Gln Ala Pro Asp Leu Glu Thr Tyr Leu Gly Asp Ala Arg Pro Tyr Met	
180 185 190	
GAC GTC ATG CTG GAT CGC ACG CCG GCC GGG ACT GTG GCC ATC GGC GGC	1122
Asp Val Met Leu Asp Arg Thr Pro Ala Gly Thr Val Ala Ile Gly Gly	
195 200 205	
ATG CAG AAG TGG GTG ATT CCG TGC AAC TGG AAG TTT GCC GCC GAG CAG	1170
Met Gln Lys Trp Val Ile Pro Cys Asn Trp Lys Phe Ala Ala Glu Gln	
210 215 220	
TTC TGC AGT GAC ATG TAC CAC GCC GGC ACC ATG TCG CAC CTG TCC GGC	1218
Phe Cys Ser Asp Met Tyr His Ala Gly Thr Met Ser His Leu Ser Gly	
225 230 235 240	
ATC CTG GCG GGC ATG CCG CCG GAA ATG GAC CTG TCG CAT GCA CAG GTG	1266
Ile Leu Ala Gly Met Pro Pro Glu Met Asp Leu Ser His Ala Gln Val	
245 250 255	
CCC ACC AAG GGC AAC CAG TTC CGG GCC GGC TGG GGC GGC CAC GCC TCG	1314

25

26

Pro Thr Lys Gly Asn Gln Phe Arg Ala Gly Trp Gly Gly His Gly Ser
 260 265 270
 GGC TGG TTC GTC GAC GAG CCG GGC ATG CTC ATG GCG GTG ATG GGG CCC 1362
 Gly Trp Phe Val Asp Glu Pro Gly Met Leu Met Ala Val Met Gly Pro
 275 280 285
 AAG GTC ACC CAG TAC TGG ACC GAA GGT CCG GCT GCC GAC CTG GCA GAA 1410
 Lys Val Thr Gln Tyr Trp Thr Glu Gly Pro Ala Ala Asp Leu Ala Glu
 290 295 300
 CAG CGA CTG GGC CAC ACC ATG CCG GTT CGA CGC ATG TTC GGC CAG CAC 1458
 Gln Arg Leu Gly His Thr Met Pro Val Arg Arg Met Phe Gly Gln His
 305 310 315 320
 ATG ACG ATC TTC CCG ACC TGT TCA TTC CTG CCC GCC ATC AAC ACC ATC 1506
 Met Thr Ile Phe Pro Thr Cys Ser Phe Leu Pro Ala Ile Asn Thr Ile
 325 330 335
 CGG ACC TGG CAC CCG CGT GGT CCC AAT GAA ATC GAG GTG TGG GCC TTC 1554
 Arg Thr Trp His Pro Arg Gly Pro Asn Glu Ile Glu Val Trp Ala Phe
 340 345 350
 ACC CTG GTC GAT GCC GAC GCC CCG GCG GAG ATC AAG GAA GAA TAT CGC 1602
 Thr Leu Val Asp Ala Asp Ala Pro Ala Glu Ile Lys Glu Glu Tyr Arg
 355 360 365
 CGG CAC AAC ATC CCG ACC TTC TCC GCA GGC GGC GTG TTT GAG CAG GAC 1650
 Arg His Asn Ile Arg Thr Phe Ser Ala Gly Gly Val Phe Glu Gln Asp
 370 375 380
 GAT GGC GAG AAC TGG GTG GAG ATC CAG AAG GGG CTA CGT GGG TAC AAG 1698
 Asp Gly Glu Asn Trp Val Glu Ile Gln Lys Gly Leu Arg Gly Tyr Lys
 385 390 395 400
 GCC AAG AGC CAG CCG CTC AAT GCC CAG ATG GGC CTG GGT CGG TGC AGA 1746
 Ala Lys Ser Gln Pro Leu Asn Ala Gln Met Gly Leu Gly Arg Cys Arg
 405 410 415
 CCG GAT CAC CCT GAT TTT CCT GGC AAC GTC GGC 1779
 Pro Asp His Pro Asp Phe Pro Gly Asn Val Gly
 420 425
 TAGCTCTACG CCGAAGAAGC GGCGCGGGGT ATGTATCACC ACTGGATCGG CATGATGTCC 1839
 GAGCCACGCT GGGCCACGCT CAAGCCCTGA TCAAGACGCA ATCGTTAGAT CTGTCAACCG 1899
 GAAGAATTCA AC 1911
 ATG GTG GGC TGG ACG TGC ATG TGC AGA CGG CGC GCC GAG GTT CCG TCC 1959
 Met Val Gly Trp Thr Cys Met Cys Arg Arg Arg Ala Glu Val Pro Ser
 1 5 10 15
 CCT GAT ATT TAC TTG GAG ATA ACT ATT ATG ACA AAT CCA TCC CCG CAT 2007
 Pro Asp Ile Tyr Leu Glu Ile Thr Ile Met Thr Asn Pro Ser Pro His
 20 25 30
 TTT TTC AAA ACA TTT GAA TGG CCA AGC AAG GCG GCT GGC CTT GAG TTG 2055
 Phe Phe Lys Thr Phe Glu Trp Pro Ser Lys Ala Ala Gly Leu Glu Leu
 35 40 45
 CAG AAC GAG ATC GAG CAG TTC TAC TAC CGC GAA GCG CAG TTG CTT GAC 2103
 Gln Asn Glu Ile Glu Gln Phe Tyr Tyr Arg Glu Ala Gln Leu Leu Asp
 50 55 60
 CAC CGG GCC TAC GAG GCC TGG TTT GCC CTG CTG GAC AAA GAT ATC CAC 2151
 His Arg Ala Tyr Glu Ala Trp Phe Ala Leu Leu Asp Lys Asp Ile His
 65 70 75 80

27

28

TAC TTC ATG CCG CTG CGC ACC AAT CGC ATG ATC CGG GAG GGC GAG CTG	2199
Tyr Phe Met Pro Leu Arg Thr Asn Arg Met Ile Arg Glu Gly Glu Leu	
85 90 95	
GAA TAT TCC GGC GAC CAG GAT ATT GCC CAT TTC GAT GAA ACC CAT GAA	2247
Glu Tyr Ser Gly Asp Gln Asp Ile Ala His Phe Asp Glu Thr His Glu	
100 105 110	
ACC ATG TAC GGG CGC ATC CGC AAG GTG ACC TCG GAC CTG GGC TGG CGC	2295
Thr Met Tyr Gly Arg Ile Arg Lys Val Thr Ser Asp Val Gly Trp Ala	
115 120 125	
GAG AAC CCG CCT TCC CGC ACG CGC CAC CTG GTC TCC AAC GTC ATC GTC	2343
Glu Asn Pro Pro Ser Arg Thr Arg His Leu Val Ser Asn Val Ile Val	
130 135 140	
AAG GAG ACG GCC ACG CCG GAT ACC TTC GAG GTC AAT TCC GCA TTC ATC	2391
Lys Glu Thr Ala Thr Pro Asp Thr Phe Glu Val Asn Ser Ala Phe Ile	
145 150 155 160	
CTG TAC CGC AAT CCG CTT GAG CGC CAG GTC GAC ATC TTC GCG GGC GAA	2439
Leu Tyr Arg Asn Arg Leu Glu Arg Gln Val Asp Ile Phe Ala Gly Glu	
165 170 175	
CGC CGG GAC GTG CTG CGC CGC GCC GAC AAC AAC CTT GGT TTC AGC ATC	2487
Arg Arg Asp Val Leu Arg Arg Ala Asp Asn Asn Leu Gly Phe Ser Ile	
180 185 190	
GCC AAG CGC ACC ATC CTG CTC GAC GCC AGT ACC TTG CTG TCG AAC AAC	2535
Ala Lys Arg Thr Ile Leu Leu Asp Ala Ser Thr Leu Leu Ser Asn Asn	
195 200 205	
CTG AGC ATG TTC TTC	2550
Leu Ser Met Phe Phe	
210	
TAGCCAGCA CGCTGAACCG GCCTCAATGA GGATGCTGCC	2590
ATG AAA AAT GCA AGA CTG TTT TTG ATC GCC ATC GGC GTC TTC TAC ATC	2638
Met Lys Asn Ala Arg Leu Phe Leu Ile Ala Ile Gly Val Phe Tyr Ile	
1 5 10 15	
ATC AAC CTC ATT GGC ACG CTT CCC TTC AGC ACG TTG GGC TTG TTT GGC	2686
Ile Asn Leu Ile Gly Thr Leu Pro Phe Ser Thr Leu Gly Leu Phe Gly	
20 25 30	
AGG ATG TAT CCA GGC GTA GAA CTG CAC GTG GGT GCG CCG ATT TTC ACC	2734
Arg Met Tyr Pro Gly Val Glu Leu His Val Gly Ala Pro Ile Phe Thr	
35 40 45	
CTG CTG CAG GAT GCC TGG GCG GTG GTC GGT CTC CAG TTG GGC GCC ATC	2782
Leu Leu Gln Asp Ala Trp Ala Val Val Gly Leu Gln Leu Gly Ala Ile	
50 55 60	
GGG GCC GTC GCT TTG TGG GGC GCC CGC GAT CCG GGC CGT TAT CGG GCC	2830
Gly Ala Val Ala Leu Trp Gly Ala Arg Asp Pro Gly Arg Tyr Arg Ala	
65 70 75 80	
GTT ATT CCA GTG GTC ATC GCA ACG GAA GTG GTC GAT GGC CTC TGG GAT	2878
Val Ile Pro Val Val Ile Ala Thr Glu Val Val Asp Gly Leu Trp Asp	
85 90 95	
TTT TAC AGC ATC GTG TGG AGC CAC GAA GCC TTG TGG TTC GGC CTT GTC	2926
Phe Tyr Ser Ile Val Trp Ser His Glu Ala Leu Trp Phe Gly Leu Val	
100 105 110	
ACG CTG GTG ATC CAT GTG CTG TGG ATT GGC TGG GGC CTG CAT GCC TGG	2974

29	30
Thr Leu Val Ile His Val Leu Trp Ile Gly Trp Gly Leu His Ala Trp	
115 120 125	
CGT GCC TGG CGT CGA AAT CGC	2995
Arg Ala Trp Arg Arg Asn Arg	
130 135	
TGAGGACACT TTGAATTACT CTTACAGCCAC CAACAGTGAC TGTTCGCCCC AGGCGATTTA	3055
ACCCTTTTAA CTAATTACAA GAAGCGTT	3083
ATG AAA TTT ACC AGA GTT TGT GAT CGA AGA GAT GTG CCC GAA GGC GAA	3131
Met Lys Phe Thr Arg Val Cys Asp Arg Arg Asp Val Pro Glu Gly Glu	
1 5 10 15	
GCC CTG AAG GTC GAA AGT GGA GGC ACC TCC GTC GCG ATT TTC AAT GTG	3179
Ala Leu Lys Val Glu Ser Gly Gly Thr Ser Val Ala Ile Phe Asn Val	
20 25 30	
GAT GGC GAG CTG TTC GCA ACA CAG GAC CGC TGC ACC CAC GGC GAC TGG	3227
Asp Gly Glu Leu Phe Ala Thr Gln Asp Arg Cys Thr His Gly Asp Trp	
35 40 45	
TCC CTG TCC GAT GGC GGC TAT CTT GAA GGT GAC GTG GTG GAA TGC TCA	3275
Ser Leu Ser Asp Gly Gly Tyr Leu Glu Gly Asp Val Val Glu Cys Ser	
50 55 60	
CTG CAC ATG GGG AAG TTT TGC GTT CGC ACG GGC AAG GTC AAA TCA CCG	3323
Leu His Met Gly Lys Phe Cys Val Arg Thr Gly Lys Val Lys Ser Pro	
65 70 75 80	
CCG CCC TGT GAG GCA CTG AAG ATA TTT CCG ATC CGC ATC GAA GAC AAT	3371
Pro Pro Cys Glu Ala Leu Lys Ile Phe Pro Ile Arg Ile Glu Asp Asn	
85 90 95	
GAC GTG CTG GTC GAC TTC GAA GCC GGG TAT CTG GCG CC	3409
Asp Val Leu Val Asp Phe Glu Ala Gly Tyr Leu Ala Pro	
100 105	
ATG ATC GAC ACC ATC GCC ATC ATC GGC GCC GGC CTG GCC GTT CGA CCG	3457
Met Ile Asp Thr Ile Ala Ile Ile Gly Ala Gly Leu Ala Val Arg Arg	
1 5 10 15	
CTG CGC GCG CAC TGC CGC CAG GGA TAC GAG GGG CGC ATC CAC CTG CTC	3505
Leu Arg Ala His Cys Arg Gln Gly Tyr Glu Gly Arg Ile His Leu Leu	
20 25 30	
GGG GAT GAG TCG CAT CAG GCC TAT GAC CGG ACC ACG CTG TCC AAG ACG	3553
Gly Asp Glu Ser His Gln Ala Tyr Asp Arg Thr Thr Leu Ser Lys Thr	
35 40 45	
GTG CTG GCG GGC GAG CAG CCC GAG CCG CCT GCA ATC CTG GAC AGC GCC	3601
Val Leu Ala Gly Glu Gln Pro Glu Pro Pro Ala Ile Leu Asp Ser Ala	
50 55 60	
TGG TAC GCA TCG GCC CAT GTG GAT GTC CAG CTC GGG CGA CGG GTG AGT	3649
Trp Tyr Ala Ser Ala His Val Asp Val Gln Leu Gly Arg Arg Val Ser	
65 70 75 80	
TGC CTG GAT CTG GCC AAC CGC CAG ATT CAG TTT GAA TCG GGC GCC CCG	3697
Cys Leu Asp Leu Ala Asn Arg Gln Ile Gln Phe Glu Ser Gly Ala Pro	
85 90 95	
CTG GCC TAC GAC CGG CTG CTG CTG GCC ACC GGC GCG CGC GCC CGG CGC	3745
Leu Ala Tyr Asp Arg Leu Leu Leu Ala Thr Gly Ala Arg Ala Arg Arg	
100 105 110	
ATG GCG ATT CGG GGT GGC GAC CTG GCA GGC ATC CAT ACC TTG CGA GAC	3793

31

32

Met Ala Ile Arg Gly Gly Asp Leu Ala Gly Ile His Thr Leu Arg Asp	
115 120 125	
CTC GCC GAC AGC CAG GCG CTG CCG CAG GCG CTG CAA CCG GGC CAG TCG	3841
Leu Ala Asp Ser Gln Ala Leu Arg Gln Ala Leu Gln Pro Gly Gln Ser	
130 135 140	
CTG GTC ATC GTC GGC GGA GGC CTG ATC GGT TGC GAG GTG GCG ACC ACC	3889
Leu Val Ile Val Gly Gly Gly Leu Ile Gly Cys Glu Val Ala Thr Thr	
145 150 155 160	
GCC CGC AAG CTG AGT GTC CAT GTC ACG ATT CTG GAA GCC GGC GAC GAG	3937
Ala Arg Lys Leu Ser Val His Val Thr Ile Leu Glu Ala Gly Asp Glu	
165 170 175	
TTG CTG GTG CCG GTG CTG GGT CAC CCG ACC GGG GCA TGG TGT CCG GCC	3985
Leu Leu Val Arg Val Leu Gly His Arg Thr Gly Ala Trp Cys Arg Ala	
180 185 190	
GAA CTG GAA CGC ATG GGT GTC CGC GTG GAG CGC AAT GCA CAG GCC GCG	4033
Glu Leu Glu Arg Met Gly Val Arg Val Glu Arg Asn Ala Gln Ala Ala	
195 200 205	
CGC TTC GAA GGC CAG GGG CAG GTG CGC GCC GTG ATC TGC GCC GAC GGG	4081
Arg Phe Glu Gly Gln Gly Gln Val Arg Ala Val Ile Cys Ala Asp Gly	
210 215 220	
CGC CGG GTG CCC GCC GAT GTG GTC TTG GTC AGC ATT GGC GCC GAG CCG	4129
Arg Arg Val Pro Ala Asp Val Val Leu Val Ser Ile Gly Ala Glu Pro	
225 230 235 240	
GCG GAC GAG CTG GCC CGT GCC GCT GGC ATC GCC TGC GCG CGC GGC GTG	4177
Ala Asp Glu Leu Ala Arg Ala Ala Gly Ile Ala Cys Ala Arg Gly Val	
245 250 255	
CTG GTC GAC GCC ACC GGC GCC ACC TCG TGT CCA GAG GTG TTC GCC GCC	4225
Leu Val Asp Ala Thr Gly Ala Thr Ser Cys Pro Glu Val Phe Ala Ala	
260 265 270	
GGT GAC GTC GCC GCC TGG CCG CTG CGT CAA GGG GGC CAG CGC TCG CTG	4273
Gly Asp Val Ala Ala Trp Pro Leu Arg Gln Gly Gly Gln Arg Ser Leu	
275 280 285	
GAG ACC TAC CTG AAC AGC CAG ATG GAG GCC GAA ATC GCG GCC AGC GCC	4321
Glu Thr Tyr Leu Asn Ser Gln Met Glu Ala Glu Ile Ala Ala Ser Ala	
290 295 300	
ATG TTG AGT CAG CCC GTG CCG GCG CCC CAG GTG CCG ACC TCG TGG ACG	4369
Met Leu Ser Gln Pro Val Pro Ala Pro Gln Val Pro Thr Ser Trp Thr	
305 310 315 320	
GAG ATT GCA GGC CAC CGC ATC CAG ATG ATT GGC GAT GCC GAA GGG CCC	4417
Glu Ile Ala Gly His Arg Ile Gln Met Ile Gly Asp Ala Glu Gly Pro	
325 330 335	
GGC GAG ATC GTC GTA CGC GGC GAC GCC CAG AGC GGC CAG CCA ATC GTG	4465
Gly Glu Ile Val Val Arg Gly Asp Ala Gln Ser Gly Gln Pro Ile Val	
340 345 350	
TTG CTC AGG CTG CTT GAT GGC TGC GTC GAG GCC GCG ACG GCG ATC AAT	4513
Leu Leu Arg Leu Leu Asp Gly Cys Val Glu Ala Ala Thr Ala Ile Asn	
355 360 365	
GCC ACC AGG GAA TTT TCT GTG GCG ACC CGA CTG GTC GGC ACC CCG GTT	4561
Ala Thr Arg Glu Phe Ser Val Ala Thr Arg Leu Val Gly Thr Arg Val	
370 375 380	

33

34

TCT GTT TCC GCC GAG CAA CTG CAG GAC GTC GGC TCG AAC CTG CGG GAT 4609
 Ser Val Ser Ala Glu Gln Leu Gln Asp Val Gly Ser Asn Leu Arg Asp
 385 390 395 400
 TTA CTC AAA GCC AAA CCG AAT 4630
 Leu Leu Lys Ala Lys Pro Asn
 405
 TGATGCGCAT GACCGGCGAA TCGCTTTAAC AATAAAGGGG ATTGGGGATT GGAAAAATGA 4690
 AACTGAAAGG TGAACGGGTA CTGTCACGGG G 4721

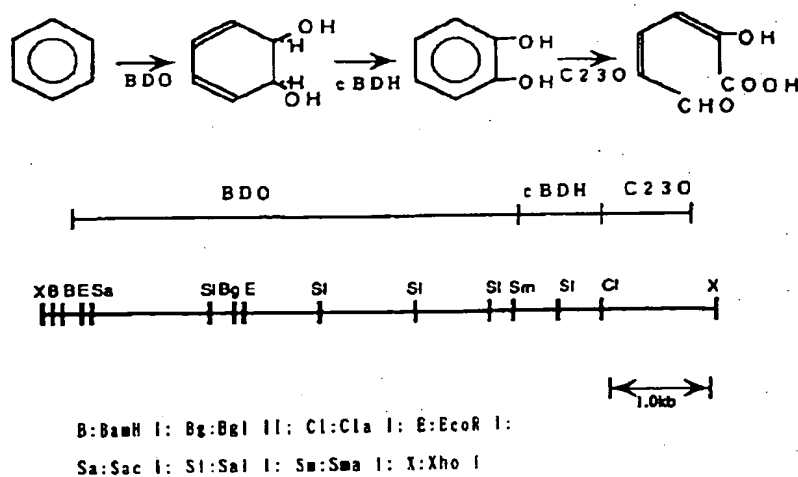
【図面の簡単な説明】

【図1】 NKKI1の制限酵素地図、及びNKKI1 10
 に含まれるベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子 (BD
 O)、シスベンゼングリコールデヒドロゲナーゼ遺伝子
 (cBDH)、及びカテコール 2, 3-ジオキシゲナー
 ゼ遺伝子 (C23O) とベンゼンの代謝様式を示す図で
 ある。

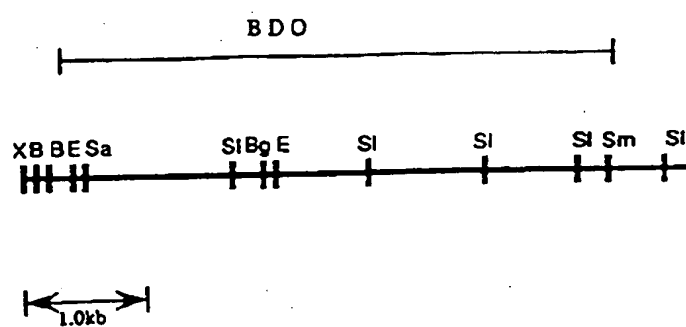
【図2】 NKKI1-1の制限酵素地図を示す図であ
 る。

【図3】 ベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子を含むNK
 KI1からベンゼンジオキシゲナーゼ遺伝子を含む組み
 換えプラスミドpBPT8-1を製造する工程を示す図
 である。

【図1】

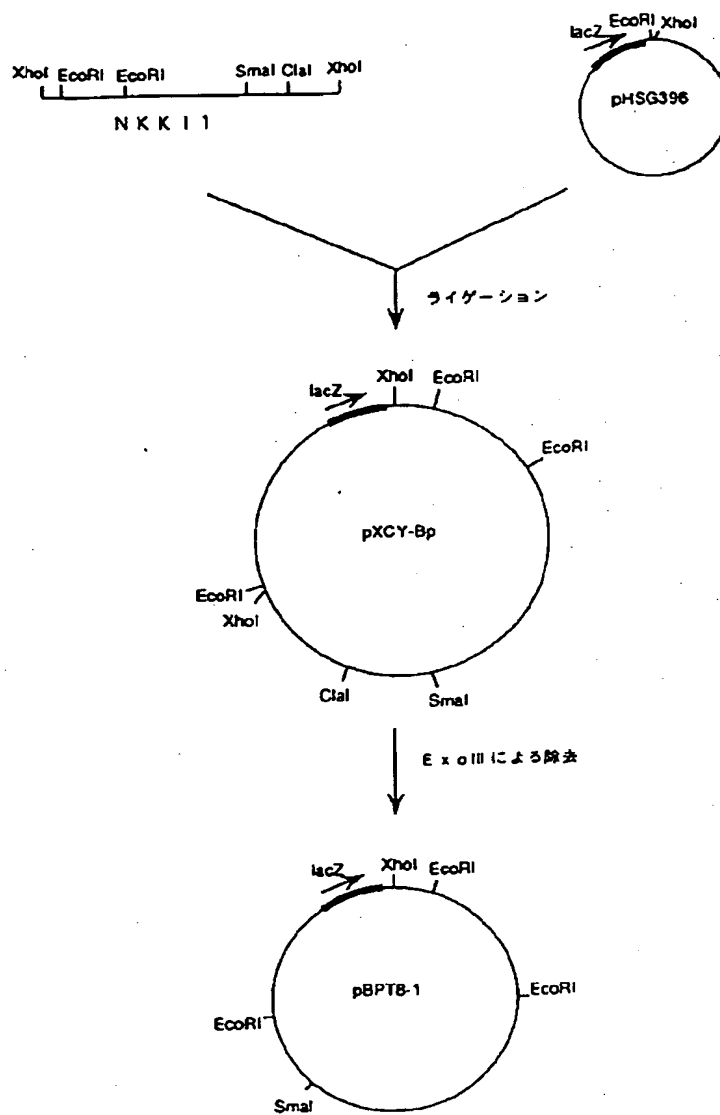


【図2】



B:BamH I; Bg:Bgl II; E:EcoR I; Sa:Sac I;
 SI:Sal I; Sm:Sma I; X:Xho I

【図 3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵

(C12N 1/21

C12R 1:19)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所